

Cinética de crecimiento y expresión de Pilina Corregulada con la Toxina (TCP) de cultivos en fermentación de la cepa 638 de *Vibrio cholerae*

Arturo Talavera, Luis Riverón, Gemma Año, Julio Oramas, Tania Valmaseda, Hilda García y Luis García.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de la cinética de crecimiento y la evaluación de la expresión de Pilina Corregulada con la Toxina (TCP) en cultivos de la cepa 638 de *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*). Para ello se realizaron 10 procesos de fermentación tomando muestras cada una hora (0 a 6^{ta} hora) para la determinación de pureza, densidad óptica, unidades formadoras de colonias y expresión de TCP por Western blot, revelado con antisuero específico anti-TCP. Los resultados obtenidos muestran altos rendimientos celulares y una cinética de crecimiento típica que sigue el modelo Monod 2, con una fase de crecimiento acelerado de 4 horas, detectándose la expresión de TCP en todos los procesos a partir de la cuarta hora de cultivo. Estos resultados sugieren la posibilidad de la aplicación de este proceso de fermentación en tecnologías de obtención de vacunas atenuadas o de subunidades de *V. cholerae*.

Palabras claves: Cinética de crecimiento, fermentación, TCP, *Vibrio cholerae*.

Introducción

Vibrio cholerae (*V. cholerae*) es una especie gramnegativa de bacilos curvos, anaerobios facultativos, no presentan altos requerimientos nutricionales, su pH de crecimiento es 7, aunque toleran pH alcalinos (8 - 9,5), pero son muy sensibles a pH ácidos (1).

Muchos han sido los medios y sistemas de cultivo utilizados para el crecimiento de *V. cholerae*, entre ellos para la obtención de biomasa el Caldo Triptona Soya y el Agar Triptona Soya (2 y 3) y específicamente para la obtención a escala de laboratorio de la Pilina Corregulada con la Toxina (TCP), el medio AKI en un sistema combinado estático y con agitación (4).

Un sistema adecuado de obtención de biomasa para uso vacunal (vacunas vivas atenuadas) debe lograr altos rendimientos celulares y en el caso de *V. cholerae* expresar TCP, debido a que se ha demostrado que esta Pilina está presente en el serogrupo O1 (biotipos, clásico y El Tor) y en el serogrupo O139 (5 y 6); así como que participa en la patogenia del cólera grave, directamente en la colonización intestinal. La delección del gen *tcpA* disminuye la capacidad de colonización en el modelo de ratón lactante y la inmunogenicidad de cepas vacunales en ensayos en voluntarios (7). Por otro lado la cepa 638 de *V. cholerae* [ctxΦ, ce/A⁺] (8) ha demostrado en ensayos en voluntarios una alta inmunogenicidad y baja reactividad al administrarse por vía oral un inóculo preparado a partir del cultivo de esta cepa en placas de Agar Triptona Soya (9).

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de la cinética de crecimiento y la evaluación de la expresión de TCP en cultivos de la cepa 638 de *V. cholerae*.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas:

- *Vibrio cholerae* E7946 El Tor Ogawa epidémica (10).
- *Vibrio cholerae* 638 El Tor Ogawa [ctxΦ, ce/A⁺] (8), la cual fue obtenida originalmente de la cepa C7258 (11) en el Laboratorio de Biología Molecular del CENIC en colaboración con el Departamento de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay.

Subcultivos realizados: A partir de un vial del banco de trabajo (-70°C) se inoculó un tubo de cultivo, el que se incubó y subcultivó en erlenmeyer, del cual se inoculó un fermentador (Chemap A.G. CF3000). Se realizaron 10 procesos de fermentación.

Muestras tomadas: Al final de los subcultivos en tubo, erlenmeyer y fermentador se tomaron muestras para las pruebas de pureza por Tinción de Gram. Durante la fermentación se tomaron las muestras desde el tiempo 0 (inoculación del fermentador) hasta la hora 6 de cultivo, determinándoseles la Densidad Óptica (D.Opt.) en un espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec III a 600 nm, el Número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC / mL) por diluciones seriadas y siembra en superficie y la expresión de Pili Corregulado por Toxina (TCP) por Western blot (4), para lo cual las muestras se centrifugaron

Cólera. Selección de Publicaciones

a 4500 g por 15 minutos en una microcentrífuga (Jouan BBVV), conservándose el sedimento a -70°C hasta su uso. Se aplicaron $80\ \mu\text{L}$ de muestra. El antisuero de conejo anti-TCP se utilizó a una concentración de $5\ \mu\text{g} / \text{mL}$ y el conjugado anti-IgG de conejo a una dilución $1 / 500$. Se empleó un patrón de pesos moleculares BIORAD 161.0317. Las muestras aplicadas como controles positivos fueron obtenidas a partir de cultivos en medio AKI (4) y también de placas de Agar Infusión Cerebro Corazón, según el método empleado para la inoculación de voluntarios (9).

Para el procesamiento de los datos y la confección de los gráficos se empleó Microsoft Excel 97 y para la determinación del modelo matemático de las fermentaciones se aplicó un programa para Cinética de

Fermentaciones de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.

Resultados y Discusión

De acuerdo con las Figuras 1 y 2 los procesos de fermentación presentan, según las determinaciones de D. Opt., una curva de crecimiento típica con una fase de crecimiento acelerado hasta la cuarta hora de cultivo, donde se observa una drástica reducción de la velocidad de crecimiento, iniciando entonces la fase estacionaria, lo que coincide con el conteo de viables (UFC / mL) a la cuarta, quinta y sexta horas de los cultivos. Por otro lado el modelo matemático de mejor ajuste para las 10 fermentaciones fue *Monod 2* con r^2 que variaron entre 0,987 y 0,997.

Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa 638 en fermentación (D. Opt. Y UFC/mL) (N = 10)

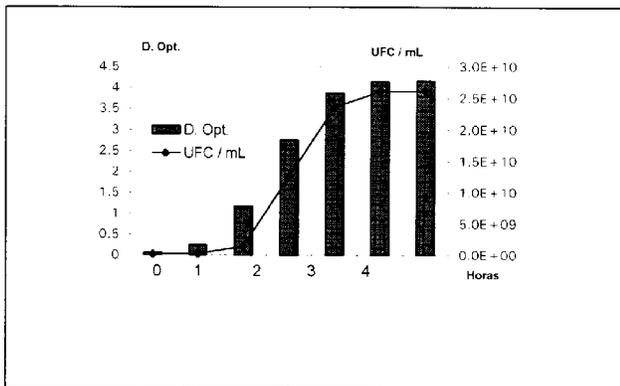
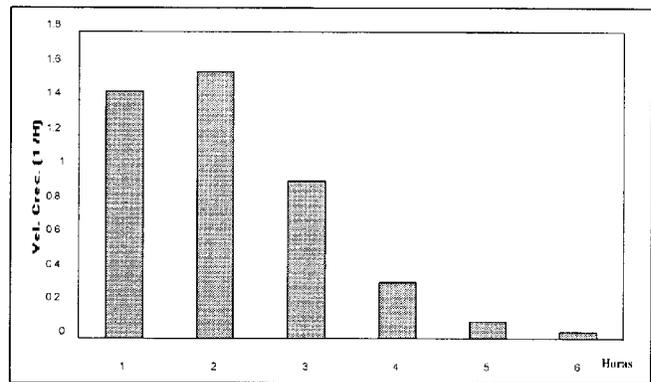


Figura 2. Velocidades de crecimiento a los diferentes tiempos de fermentación de la cepa 638 (N = 10)



En cuanto a la expresión de TCP en los cultivos, en la Figura 3 se presentan los resultados de una fermentación como ejemplo típico de las fermentaciones realizadas, pudiendo observarse que ambos controles presentaron una única banda en la posición correspondiente al peso molecular de la subunidad estructural del TCP y que las muestras de fermentación la presentan de igual forma pero

a la cuarta, quinta y sexta hora de cultivo. En la Figura 4 se presentan los resultados de otras dos fermentaciones pero solamente de la cuarta a la sexta hora, pudiéndose ver la coincidencia de las bandas correspondientes a estos carriles con la de los controles positivos y en igual posición que en la Figura 3.

Figura 3. Western blot con suero específico anti-TCP de diferentes tiempos de cultivo de la cepa 638 de *V. cholerae*

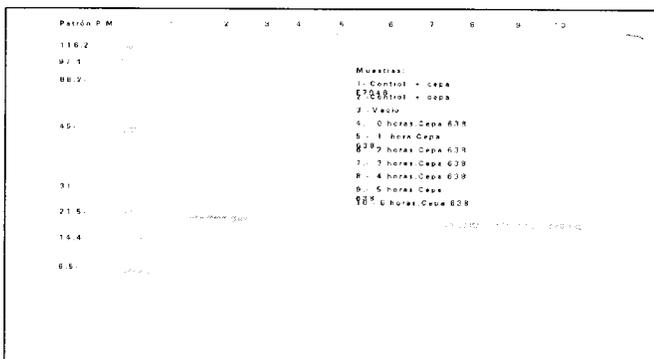
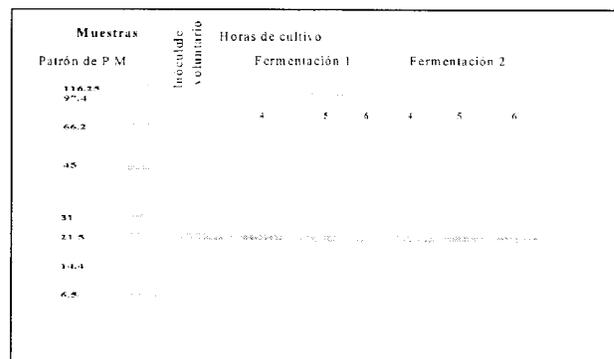


Figura 4. Western blot con suero específico anti-TCP de diferentes tiempos de cultivo de fermentaciones de la cepa 638 de *V. cholerae*



A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, donde se presenta un proceso de fermentación para la obtención de biomasa de la cepa 638 de *V. cholerae*, podemos señalar que éste está caracterizado por incrementos de la biomasa del orden de 69 y 153 veces, evaluado por un método de recuento total (D. Opt.) y por conteo de viables (UFC / mL) respectivamente y por una curva de crecimiento típica con ajuste al modelo matemático Monod 2.

Referencias

1. Kaper J B, Morris J G y Levine M. Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995; 8(1):48-86.
2. Chongsa-nguan M, Chaicumpa W, Ruankunaporn Y y Louareesuwan S. Immunogenicity of two formulations of oral cholerae vaccines in Thai volunteers. *Vaccine*. 1991; 9:55-59.
3. Talavera A, Moreira T, Año G, Cedré B, Delgado H, García H M y García L. Viabilidad "in vitro" y colonización en ratones neonatos de una formulación vacunal de la cepa 638 de *Vibrio cholerae*. Revista CENIC *Ciencias Biológicas* (en prensa). 1999.
4. Jonson G, Osek J, Svennerholm A-M y Holmgren J. Immune mechanism and protective antigens of *Vibrio cholerae* serogroup O139 as a basis for vaccine development. *Infect. Immun*. 1996; 64:3778-3785.
5. Rhine J A y Taylor R K. TcpA pili sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol*. 1994; 13:1013-1020.
6. Hall R H, Khambaty F M, Kothary M y Keusler S P. Non O1 *Vibrio cholerae*. *Lancet*. 1993; 342:430.
7. Herrington D A, Hall R H, Lusonky G, Mekalanos J J, Taylor R K y Levine M M. Toxin, toxin-corregulated pili and toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J. Exp. Med*. 1988; 108: 1487-1492.
8. Robert A, Silva A, Benítez JA, Rodríguez B L, Fando R, Campos J, Sengupta D K, Finkelstein M. B. y Finkelstein R. A. Taging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccine*. 1996;14:1517-1522.
9. Benítez J A, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, Pérez A, Campos J, Rodríguez B L, Pérez J L, Valmaseda T, Pérez O, Sierra A P, Ramírez M, Ledón T, Jidy M D, Lastre M y Sierra G. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new ctx ϕ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor candidate cholera vaccine strain. *Infect. Immun*. 1999;67(2); 539-545.
10. Levine MM, Black RE, Clements ML, Cisneros L, Saah A, Nalin DR, Gill DM, Craig JP, Young CR y Ristaino P. The pathogenicity of nonenterotoxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O1 biotype El Tor isolated from sewage water in Brazil. *J. Infect. Dis*. 1982; 45(3):296-299.
11. Häse CC, Thai LS, Boesman-Finkelstein M, Mar VL, Burnrtte WN, Kaslow HR, Stevens LA, Moss J y Finkelstein RA. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analogs. *Infect. Immun*. 1994; 62:3051.